

PCT

世界知的所有権機関

国際事務局



BL

## 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 6 C12N 9/64	AI	(11) 国際公開番号 WO 95/11966  (43) 国際公開日 1995年5月4日 (04.05.95)
(21) 国際出願番号 PCT/JP94/01807 (22) 国際出願日 1994年10月27日 (27. 10. 94) (30) 優先権データ 特願平5/292499 1993年10月29日 (29. 10. 93) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 財団法人 化学及血清療法研究所 (JURIDICAL FOUNDATION THE CHEMO-SERO-THERAPEUTIC RESEARCH INSTITUTE) (JP/JP) 〒860 熊本県熊本市清水町大窪668番地 Kumamoto, (JP) 帝人株式会社 (TEIJIN LIMITED) (JP/JP) 〒541 大阪府大阪市中央区南本町1丁目6番7号 Osaka, (JP) (72) 発明者: および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 緒方洋一 (OGATA, Yoichi) (JP/JP) 〒862 熊本県熊本市保田窪本町767-9 Kumamoto, (JP) 野内俊伸 (NOUCHI, Toshinobu) (JP/JP) 〒862 熊本県熊本市水前寺1丁目22-18 Kumamoto, (JP) 中平伸二 (NAKAHIRA, Shinji) (JP/JP) 〒862 熊本県熊本市武蔵ヶ丘8丁目6-10-205 Kumamoto, (JP) (74) 代理人 弁理士 青山 保, 外 (AOYAMA, Tamotsu et al.) 〒540 大阪府大阪市中央区城見1丁目3番7号 IMPビル 青山特許事務所 Osaka, (JP)	(81) 指定国 AU, CA, CN, KR, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). 添付公開書類 国際調査報告書	
(54) Title : HUMAN ACTIVATED PROTEIN C PREPARATION AND PROCESS FOR PRODUCING THE SAME (54) 発明の名称 ヒト活性化プロテインC調製物及びその製法 (57) Abstract <p>A human activated protein C preparation having a high specific activity and being substantially free from thrombin or equivalent protease and/or nonactivated protein C. The preparation has a specific activity higher than 3500 V/mg in the test wherein the activated partial thromboplastin time (APTT) serves as an index. The production process is based on the method of purifying a human activated protein C by activating protein C with thrombin, etc., bringing a solution containing the activated protein C into contact with a cation exchanger to adsorb the thrombin and the activated protein C, and eluting only the activated protein C.</p>		

BEST AVAILABLE COPY

高い比活性を有しトロンビンまたは等価なプロテアーゼおよび／または未活性化プロテインCを実質的に含んでいないヒト活性化プロテインC調製物並びにその製法を提供する。

活性化トロンボプラスチン時間(APTT)を指標とする検定において3500単位/mgより高い比活性を示し、トロンビンまたは等価なプロテアーゼおよび／または未活性化プロテインCを実質的に含んでいないことを特徴とするヒト活性化プロテインC調製物であり、該調製物の調製はトロンビン等によるプロテインCの活性化後、ヒト活性化プロテインC含有溶液を陽イオン交換体に接触させてトロンビンと活性化プロテインCを吸着させ、次にヒト活性化プロテインCのみを溶出させることを特徴とするヒト活性化プロテインCの精製法に基づく。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AM	アルメニア	DK	デンマーク	LI	リヒテンシュタイン	PT	ポルトガル
AT	オーストリア	EE	エストニア	LK	スリランカ	RO	ルーマニア
AU	オーストラリア	ES	スペイン	LR	リベリア	RU	ロシア連邦
BB	バルバドス	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SD	スーダン
BE	ベルギー	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SE	スウェーデン
BF	ブルキナ・ファソ	GA	ガボン	LV	ラトヴィア	SI	スロヴェニア
BG	ブルガリア	GB	イギリス	MC	モナコ	SK	スロヴァキア共和国
BJ	ベナン	GE	グルジア	MD	モルドバ	SN	セネガル
BR	ブラジル	GN	ギニア	MG	マダガスカル	SZ	スワジランド
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	ML	マリ	TD	チャド
CA	カナダ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	TG	トーゴ
CF	中央アフリカ共和国	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	TJ	タジキスタン
CG	コンゴ	IT	イタリア	MW	マラウイ	TT	トリニダード・トバゴ
CH	スイス	JP	日本	MX	メキシコ	UA	ウクライナ
CI	コート・ジボアール	KE	ケニア	NE	ニジェール	UG	ウガンダ
CM	カメルーン	KG	キルギスタン	NL	オランダ	US	米国
CN	中国	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NO	ノルウェー	UZ	ウズベキスタン共和国
CZ	チェコ共和国	KR	大韓民国	NZ	ニュージーランド	VN	ヴェトナム
DE	ドイツ	KZ	カザフスタン	PL	ポーランド		

## 明 細 書

## ヒト活性化プロテインC調製物及びその製法

技術分野

本発明は、血漿から誘導されたかまたは遺伝子組換え技術により製造され、トロンビンまたは等価なプロテアーゼによるヒトの未活性化プロテインCの活性化工程を経て製造される高い比活性を有するヒト活性化プロテインC調製物に関する。さらに、ヒトプロテインCの活性化法、ヒト活性化プロテインCの高純度精製方法にも関する。

背景技術

プロテインC(Protein C: 以下、PCと略記することがある)は肝臓で合成されるビタミンK依存性蛋白質の一つであり、L鎖(分子量21,000)とH鎖(分子量41,000)の2本鎖よりなる分子量62,000の酵素前駆体である。プロテインCは生体内では血管内皮細胞膜上のトロンボモジュリンにトロンビンが結合したトロンビン-トロンボモジュリン複合体により限定分解を受けH鎖のアミノ末端より12個のペプチドを遊離し活性化プロテインC(Activated Protein C: 以下、APCと略記することがある)となる。APCはセリンプロテアーゼの一種であり、血液凝固第V、第VIII因子(主として活性型のVa, VIIIa)を特異的に分解し失活させることにより抗凝固活性を発揮し、また、血管壁からのプラスミノゲン・アクティベーターの放出を助長し、線溶系を促進させる働きを有していることから医薬品としての開発が期待されている。

本発明の対象であるAPC自身は当該技術分野で周知であり、血漿から誘導されたかまたは遺伝子組換え技術により調製されたプロテインCを、トロンビンまたはトロンビン-トロンボモジュリン複合体でin vit

roで活性化したもの(ブラッド Blood, 63, p. 115-121(1984)、ジャーナル オブ クリニカル インベスティゲーション J. Clin. Invest., 64, p. 761-769(1979)、ジャーナル オブ クリニカル インベスティゲーション J. Clin. Invest., 79, p. 918-925(1987))、あるいは遺伝子組換え技術によって直接APCとして発現させることにより得られるものなどが知られている(特開昭61-205487号、特開平1-2338号、特開平1-85084号)。

ところが、APCを調製していく過程において、とりわけ血漿よりプロテインCを分画し、活性化工程を経て当該目的蛋白質を調製する場合、APCと物理化学的性質のよく似た夾雑蛋白質を効率的に除去し、APCのみを高度に精製し所望の高比活性を有するAPCを得るためには克服すべき種々の問題がある。例えば、プロテインCからAPCへの効率的な活性化、それに続く活性化剤の除去、さらにAPCの精製方法にはなお、多くの検討課題が残っている。

プロテインCの活性化方法としてはトリプシン、RVV-X、トロンビン、トロンビントロンボモジュリンによる活性化やセファロースにRVV-Xを固定化したゲルを用いた活性化方法、トロンビントロンボモジュリン複合体を固定化したゲルを用いた活性化方法等が知られている(ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー J. Biol. Chem., 251, 3052-3056(1976)、バイオケミストリー Biochemistry, 15, 4893-4900(1976)、バイオケミストリー Biochemistry, 16, 5824-5831(1977)、ジャーナル オブ クリニカル インベスティゲーション J. Clin. Invest., 64, 761-769(1977)、バイオケミカル バイオフィジカル リサーチ コミュニケーション Biochem. Biophys. Res. Commun., 94, 340-347(1980)、ジャーナルオブクリニカル インベスティゲーション J. Clin. Invest., 77, 416-425(1986))。

しかし、上記の方法は工業的な大量生産においては満足できるものではない。また、大量のプロテインCを活性化するには高濃度のプロテインCを少ない量の活性化剤で処理することが好ましいが、これを満足するにも至っていない。

また、活性化後の活性化プロテインCの精製ではS P-セファデックスクロマトグラフィーにより、A P Cを素通り画分に展開し活性化の際に添加したトロンビン を吸着除去する方法が知られている(バイオケミストリー Biochemistry, 16, 5824-5831(1977)、ジャーナル オブクリニカル インベスティゲーション J. Clin. Invest., 64, 761-769(1979)、ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー J. Biol. Chem., 251, 3052-3056(1976)、バイオケミストリー Biochemistry, 20, 2156-2161(1981))。しかし、活性化の際に添加したトロンビン を陽イオン交換体を用いて臨床に適応できるレベルまで除去することは難しく、さらに、實際上この操作の後にA P Cの濃縮操作が不可欠であり、濃縮時のA P Cの自己分解を避けることが困難であった。従って、現状においては各種の蛋白質の夾雑のない、高純度で高い生物活性を有するA P C調製物を得るまでには至っていない。

#### 発明の開示

本発明は上記の課題を解決すべく創案されたもので、本発明者らが鋭意検討を重ねた結果、プロテインCを高濃度で活性化することにより少量のトロンビンで効率良く活性化することが可能であること、活性化後の活性化プロテインC含有溶液を陽イオン交換体に接触させ、一旦トロンビンまたは等価なプロテアーゼと活性化プロテインCを吸着させ、好適な塩濃度の条件で活性化プロテインCのみを溶出する方法により、トロンビンまたは等価なプロテアーゼおよび/または未活性化プロテインCを実質的に含んでいないヒト活性化プロテインC調製物が得られること、さらに驚くべ

きことに、かくして得られたヒト活性化プロテインC調製物が従来法で得られたヒト活性化プロテインCに比べて極めて高い比活性を有することを見いだして完成されたものである。即ち、本発明は、高い比活性を示し、トロンビンまたは等価なプロテアーゼおよび／または未活性化プロテインCを実質的に含んでいないヒト活性化プロテインC調製物並びにその製法を提供することを目的とする。

#### 図面の簡単な説明

図1. 本発明の調製物及び従来の調製物のSDS-PAGEの結果を示す図である。

#### 発明を実施するための最良の形態

本発明のヒト活性化プロテインC調製物は、正常ヒト血漿の活性化トロンボプラスチン時間(APTT)を2倍に延長する量として定義される単位に基づく活性単位を指標として、3500単位/mgより高い比活性を示し、トロンビンまたは等価なプロテアーゼおよび／または未活性化プロテインCを実質的に含んでいない。また、本発明の該調製物の調製に際して、トロンビンまたは等価なプロテアーゼによる活性化後、ヒト活性化プロテインC含有溶液をpH5.0～6.0、NaCl濃度80mM以下の条件で陽イオン交換体に接触させ、トロンビンと活性化プロテインCを吸着させ、塩濃度0.1～0.35Mの条件でヒト活性化プロテインCのみを溶出させることにより、高度精製ヒト活性化プロテインCを回収することができる。

上記プロテインC含有溶液中のプロテインCをトロンビンまたは等価なプロテアーゼを用いて活性化するに際しては、プロテインC濃度0.5～8.0mg/mlのプロテインC含有溶液に対しトロンビンをトロンビン／プロテインC 1～20(U/mg)の割合で添加し、pH6.0～8.0の条件で活性化することにより効率よく大量のプロテインCを活性化する

ことができる。さらに、この工程に続く活性化剤の除去、APCの精製工程においては、活性化後のAPC含有溶液をpH5.0～6.0、NaCl濃度80mM以下の条件で陽イオン交換体に接触させてトロンビンとAPCを吸着させ、ついで塩濃度0.1～0.35Mの条件で活性化プロテインCのみを溶出させる。

本発明のヒトプロテインC活性化法では、プロテインCを高濃度で活性化することにより少量のトロンビンで効率良く活性化することが可能である。このことは活性化中のプロテインCの分解を少なくし、またその後のトロンビン除去を容易にするという利点を持つ。その後のAPCの精製工程では、溶出液中のトロンビン濃度を0.001単位/ml以下にすることができ、定量的にAPCを回収できる。また、APCを吸着させてから溶出するため、濃縮されたAPCを得ることができる。さらに、本発明の方法によって回収されたAPC調製物は従来の方法によって得られる調製物に比して極めて高い比活性を有する。

本明細書においてヒト活性化プロテインC調製物の比活性とは、APC活性/蛋白質mgの比率を意味し、またAPC活性の1単位とは、正常ヒト血漿の活性化トロンボプラスチン時間(APTT)を2倍に延長する量として定義する。従って、実際のAPC活性の測定は、希釈したサンプルを正常ヒト血漿に加えてAPTT(秒)を測定し、その値が対照の値の2倍となる時の希釈倍率を、サンプルのAPC活性値とする。

本発明に係る調製物の主成分であるAPC、および本発明に係る製法の出発原料であるプロテインCの由来は特に制約はないが、ヒト血漿に由来するものが好適に適用され得る。

上述の本発明の工程における活性化工程は以下の手順で進められる。プロテインC濃度0.5～8.0mg/mlのプロテインC含有溶液に対しト

ロンビンをトロンビン／プロテインC 1～20(U/mg)の割合で添加し、pH6.0～8.0、塩濃度0.1～0.15Mの条件下、好適な条件、例えば37℃で5～6時間反応させる。

上記の活性化工程により処理された反応液は必要に応じて、pH調整、塩濃度調整を施された後に、陽イオン交換体処理に付してAPCの精製がなされる。この陽イオン交換体処理により、トロンビンが除去されさらに未活性化プロテインC等の夾雑蛋白質が除かれる。使用される陽イオン交換体としては陽イオン交換基(例えば、スルホ基、カルボキシ基)を有する不溶性担体であればいずれも使用することができ、より具体的には、当分野で慣用の陽イオン交換体、例えば、S-セファロース(商品名)、SP-セファデックス(商品名)(いずれもファルマシア社製)、SP-トヨパール(商品名)、TSKゲルSP-5PW(商品名)(いずれも東ソー社製)等の陽イオン交換樹脂が例示され、SP-セファデックス、SP-トヨパールは好ましい態様である。本方法はカラム法、バッチ法のいずれの方法でも可能であるが、夾雑蛋白質の除去効率の面からカラム法で行なうのが好ましい。

本発明のAPCの精製工程においては、活性化反応溶液を陽イオン交換体に接触させ、トロンビンとAPCを吸着させ、塩濃度0.1～0.35Mの条件で活性化プロテインCのみを溶出することに大きな特徴を有する。かかる精製法によって調製されたAPC調製物はトロンビンまたは等価なプロテアーゼおよび／または未活性化プロテインC等の夾雑蛋白質を実質的に含んでおらず、APC活性に係る比活性も3500単位/mg以上と極めて高い。

さらに、本件発明者らはプロテインC画分より所望の高比活性のAPCを調製する一連の工程のなかで、従来法の欠点を補うべく検討を重ねた結果、いくつかの有用な改善方法を創案し、本発明の効果をさらに増長させ



得るに至った。

プロテインCの精製法としてはクエン酸バリウム吸着沈殿、硫酸分画、DEAE-セファデックスカラムクロマトグラフィーで精製したプロテインCを、さらに、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、デキストラン硫酸アガロースクロマトグラフィー等の方法により精製する方法や、プロテインCに対する抗体を固定化したゲルを用いて精製する方法などが知られている(ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー J. Biol. Chem., 251, 355-363(1976)、ジャーナル オブ クリニカル インベスティゲーション J. Clin. Invest., 64, 761-769(1979)、ブラッド Blood, 54, 1272-(1979)、フェブス レターズ FEBS LETTERS, 191, 75-81(1985)、ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー J. Biol. Chem., 261, 11097-11105(1986))。しかし、上記の方法は実験室レベルのものであり、収率、作業効率等を考えると工業的な大量精製には不向きである。また、プロテインCに対する抗体を固定化したゲルを用いた精製では、溶出に強力なカオトロピックイオンや酸性pHを用いたり、EDTAのような強力なキレート剤を用いるが、溶出液中にゲルより脱離したわずかな量のプロテインCに対する抗体が含まれることが問題となる。

本発明では強力なキレート剤であるEDTAの代わりにクエン酸緩衝液を用いてプロテインCを溶出することによりゲルより脱離するプロテインCに対する抗体を低減できることを見い出した。さらに、得られたプロテインC含有溶液を陰イオン交換体にpH 7.0~9.0の条件で吸着させ、僅かに含まれるプロテインCに対する抗体を除去した後に、塩濃度0.3~1.0Mの条件でプロテインCを溶出することで殆どのプロテインCに対する抗体を除去することができる。

上記の知見に基づき、本発明によって下記の工程で示される工業スケー

ルでの改善された活性化プロテインCの調製方法が提供される。

- (1) ヒトプロテインCを含有する溶液を陰イオン交換体に吸着させた後、溶出させ、G1aドメインを有するヒトプロテインC画分を調製し、
- (2) ヒトプロテインCを含有する溶液を、カルシウムイオンと結合したプロテインCを特異的に認識する抗体を不溶性担体と結合した吸着体にカルシウム存在下で吸着させ、クエン酸緩衝液を用いて当該プロテインCを溶出し、
- (3) プロテインC含有溶液を陰イオン交換体に吸着させた後、溶出させて上記プロテインC含有溶液より抗プロテインC抗体を除去し、
- (4) ヒトプロテインCをトロンビンまたは等価なプロテアーゼを用いて活性化する際に、ヒトプロテインCを含有する溶液にpH 6.0～8.0の条件でトロンビンをトロンビン/プロテインC 1～20(U/mg)の量比で添加してヒトプロテインCを活性化し、ついで
- (5) 活性化後のヒト活性化プロテインC含有溶液をpH 5.0～6.0、塩濃度80mM以下の条件で陽イオン交換体に接触させてトロンビンと活性化プロテインCを吸着させ、ついで塩濃度0.1～0.35Mの条件でヒト活性化プロテインCのみを溶出させ回収する。

精製された活性化プロテインCを医療用に使用する場合には、とりわけヒト血漿を原料とする場合、原料由来のウイルス(例えば肝炎ウイルス、HIVなど)による感染の危険性があり、ウイルスの除去、不活化が必要となる。血液製剤におけるウイルス感染防止対策としては原料のスクリーニング、膜濾過、吸着、カラムクロマトグラフィー、沈殿分画による除去、ソルベントデタージェント法、 $\beta$ -プロピオラクトン、加熱処理、電磁波照射による不活化等を組み合わせた形で行なわれるが、蛋白質の変性、生理活性の低下、回収率の低下等を伴わずにウイルスの除去、不活化を行な

うことは難しい。本発明では、ウイルス除去膜を用いた膜濾過によるウイルスの除去および0.5～10%(W/V)のアルブミンを安定剤とする凍結乾燥加熱が活性化プロテインC製剤のウイルス除去、不活化に対して有効であることを見い出した。本方法を用いれば活性化プロテインCの変性、生理活性の低下、回収率の低下が無く効率良くウイルスの除去、不活化が可能である。

本発明者らは、効率の良い精製方法およびプロテインCの活性化方法、更には医療用に使用する場合のウイルス感染防止対策を検討したところ、抗プロテインC抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーでのプロテインCの精製において溶出にクエン酸緩衝液を用いる方法、高濃度でのプロテインCの活性化方法、陽イオン交換体を用いて活性化プロテインCを吸着させ精製する方法が有効であることを見い出した。そして、これらを軸とする精製方法を用いて調製を行ない、ウイルス除去膜によるウイルスの除去および凍結乾燥加熱によるウイルス不活化を施すことにより、効率良く高収率で高純度の医療用に使用しうる活性化プロテインCを大量生産できる技術を確立した。

本発明に係るAPC調製物は、夾雑蛋白質の混入の程度が低いのみならず、前述の従来の方法、例えばバイオケミストリー Biochemistry, 16, 5824-5831(1977)で開示された方法で調製されたAPC等よりも高い比活性(APC活性/蛋白質mg)を有することに大きな特長があり、実際、本発明のAPC調製物の活性は従来調製物の1.5～2倍の比活性を示す。比活性の上昇の主因についてはなお検討を要するところであるが、従来方法では達成することのできなかつた夾雑タンパク質(APCの分解物、未活性化プロテインCあるいは凝集タンパク質等)の除去も主要な要因の一つであろうと推察される。

以下、本発明をより詳細に説明するため、実施例を挙げるが、本発明はこれらの実施例になんら限定されるものではない。

### 実施例 1

#### 1.1 高比活性活性化プロテインC調製物の調製

血漿由来のプロテインC調製物溶液(プロテインC 8.7 mg/ml、pH 7.5、電気電導度 34.3 ms/cm)を 20 mM クエン酸/0.1 M 塩化ナトリウム 緩衝液(pH 6.0)に透析後、プロテインC濃度 4 mg/ml に希釈した。この溶液にヒトトロンビンを最終濃度 60 U/ml になるように添加し、37℃で5時間加温してプロテインCを活性化した。

活性化後、トロンビンの除去を行なう為に活性化後の溶液を 20 mM クエン酸緩衝液(pH 6.0)で2倍に希釈し、陽イオン交換体(SP-トヨパール)のカラムに添加した。60 mM の塩化ナトリウムを含む 20 mM クエン酸緩衝液(pH 6.0)で十分に洗浄し、0.3 M の塩化ナトリウムを含む 20 mM クエン酸緩衝液(pH 6.0)で活性化プロテインCを溶出させた。この条件ではトロンビンの溶出はなく活性化プロテインCのみが溶出された。残存トロンビン濃度は 0.001 単位/ml 以下であった。得られたAPC調製物の比活性は 4750.9 U/mg であった。

#### 1.2 活性化後の陽イオンクロマトグラフィーにおけるAPCの吸着・溶出条件の検討

##### 1) 吸着条件

20 mM クエン酸緩衝液を用いて、APCの安定性の観点から現実的な pH 6.0~7.0、塩濃度 0.0~0.15 M の範囲での APC の吸着条件を検討した。pH 7.0、塩濃度 0.1 M では APC は殆ど吸着しない。pH 6.5、塩濃度 0.1 M では APC は一部分吸着するものの、大部分は素通り画分に展開される。pH 6.0、塩濃度 0.1 M では大部分の APC は

クロマト担体に吸着された。

この結果を基にpHを6.0に固定し、塩濃度を変化させてAPCの吸着の度合を検討したところ、塩濃度0.15MではAPCのみならず活性化に使用したトロンビンの一部も素通り画分に展開された。塩濃度0.1Mでは前述のように大部分のAPCは吸着されるが、充分ではなく一部が素通り画分に溶出する。そこで、塩濃度を80mM以下にしたところ、APCのクロマト担体への好適な吸着が認められた。

## 2) 溶出条件

60mM NaClを含む20mMクエン酸緩衝液(pH6.0)で平衡化した後に、60mM~0.5M NaCl濃度でグラジエント溶出を行なった。NaCl濃度が0.1M程度から徐々にAPCの溶出が始まり、0.35M以上ではトロンビンの混入が観られる。従って、溶出条件としては0.35M未満のNaCl濃度が好ましい。

## 参考例1

(従来法に基づく活性化プロテインC調製物の調製)

前記プロテインC調製物溶液(プロテインC 8.7mg/ml、pH7.5、電気電導度34.3ms/cm)を50mM Tris-HCl/0.15M塩化ナトリウム 緩衝液(pH8.0)に透析後、プロテインC濃度0.7mg/mlに希釈した。この溶液にトロンビンを最終濃度10U/mlになるように添加し、37℃で5時間加温してプロテインCを活性化した。活性化後、反応溶液を50mM Tris-HCl/0.15M塩化ナトリウム 緩衝液(pH8.0)で洗浄・平衡化した陽イオン交換体(SP-トヨパール)のカラムに添加した。かくしてトロンビンを吸着させ、素通り画分の活性化プロテインCを回収した。この溶液中の活性化プロテインCの比活性は3259.6U/mgであった。

## 実施例 2

(本発明の調製物と従来の調製物との比較)

実施例 1 及び参考例 1 に記載の調製物を用いて、比活性並びに電気泳動を用いた純度等の観点から比較した。

### 2.1 活性化プロテイン C の活性測定

本発明において、活性化プロテイン C の活性測定は、以下の方法により実施した。

A P C 活性 1 単位は正常ヒト血漿の活性化トロンボプラスチン時間(A P T T(秒))を 2 倍に延長する量と定義する。従って、A P C 活性測定法は、希釈した試料を正常ヒト血漿に加えて A P T T(秒)を測り、その値が対照(緩衝液)の値の 2 倍となるときの希釈倍率を試料の A P C 活性値とする。

(操作法)

試料を 1 % H S A 添加ベロナール緩衝液で、例えば 4 0 0、5 0 0、8 0 0、1 0 0 0 倍になるように希釈する。3 7 °C で、対照(緩衝液)または試料の各希釈液の各々 1 0 0 μ l に、正常ヒト血漿(例えば、サイトロー ル・I : 国際試薬) 1 0 0 μ l、A P T T 試薬(例えば、アクチン : 国際試薬) 1 0 0 μ l を 1 5 秒間隔で加えて混和し、2 分後、0.025 M C a C l<sub>2</sub> 1 0 0 μ l を加え凝固時間を測定する。

(活性の計算)

対照及び試料の各希釈倍率(X)での A P T T の値(Y)から、 $10^3/X$  と Y の直線回帰式と相関係数を求める。

$$Y = A (10^3/X) + B$$

対照の A P T T(秒)の 2 倍の値を  $Y_1$  として、

$$X_1 = 10^3 \{ (Y_1 - B) / A \}$$

から求めた $X_1$ の値を、試料のAPC活性(単位/ml)とする。

(タンパク質定量)

活性化プロテインCの濃度は吸光度 $A_{280}$ の測定に基づいて定量した。即ち、APC 1%(W/V)の濃度(10 mg/ml)の $A_{280}$ が、APCのアミノ酸組成より14.5と推測されるという根拠に基づく(ジャーナルオブクリニカル インベスティゲーション J. Clin. Invest., 64, 761-769(1979))。従って、活性化プロテインCの濃度は以下の式により算出される。

$$\text{活性化プロテインCの濃度(mg/ml)} = A_{280}\text{測定値} / 1.45$$

上述のAPC活性測定値及びAPCの濃度を基に本発明において使用されるAPCの比活性(U/mg)を算出した。

## 2.2 活性化条件の差異によるAPC比活性への影響

活性化直後の試料を用いて活性化条件の差異による比活性への影響を検討した。活性化後のAPC活性の測定では、測定前において、試料1 ml に対しアンチトロンビン-III、ヘパリンを各々1 U、10 U添加後、37℃で30分加温し、トロンビンを不活性化して測定した。結果を表1に示す。従来法(pH 8.0、NaCl濃度 0.15 M)と比較して、本発明の活性化条件(pH 6.0、NaCl濃度 0.1 M)は、比活性に対する影響はない。

表 1

	従 来 法	本 発 明
蛋白濃度(mg/ml)	0.72	1.38
活 性(U/ml)	2069.9	4133.4
比 活 性(U/mg)	2885.9	3089.3

## 2.3 陽イオンクロマト処理前後での比活性の比較

種々の試料を用いて、本発明の陽イオンクロマト処理前後でのAPC比活性の比較を行なった。結果を表2にまとめる。従来法では比活性の上昇は殆ど認められないが、本発明の調製物はいずれもAPC比活性(U/mg)4500以上であり、クロマト処理の前後で約1.5倍に上昇している。この比活性の上昇の主因についてはなお検討を要するところであるが、従来の方法では達成することのできなかつた夾雑タンパク質(APCの分解物、未活性化プロテインCあるいは凝集タンパク質等)の除去も本発明の調製物の完成に寄与しているものと推察される。

表 2

試 料	比活性(U/mg)		上昇率 (倍)
	クロマト前	クロマト後	
本発明 1	3089.3	4750.9	1.54
本発明 2	3108.3	5750.5	1.85
本発明 3	3869.5	5107.8	1.32
従来調製物	2885.9	3259.6	1.13



## 2.4 陽イオンクロマト処理前後での電気泳動による比較

従来法においては陽イオンクロマト工程で、pH 8.0でAPCを素通りさせていたが、本発明ではpH 6.0でAPCをいったん吸着させてから溶出させる。図1に、両方法でのSDS-PAGEの結果を示す。

本発明で実施されるpH 6でAPCを吸着させ、未活性化プロテインCを素通りさせる方法では、APCより高分子の画分及び低分子領域の画分のバンドが除去される。また、pH 8.0で素通りさせた画分に比較して、pH 6.0で吸着・溶出させた画分ではAPCに該当するバンドがシャープになっており、おそらく未活性化プロテインCが除去されているものと思われる。一方、従来法によって得られる素通り画分は、APCより高分子の画分及び低分子領域の画分のバンドの多少の量的な減少が認められるものの完全には除去しきれていない。

## 2.5 APC調製物中の未活性化プロテインCの含量

本発明による高比活性APCの比活性上昇の原因の一つとして、調製物中の未活性化プロテインC含量の低下が考慮された。そこで、本発明のAPC調製物並びに従来法による調製物中の未活性化プロテインC含量を測定した。測定は未活性化プロテインCに特異的なモノクローナル抗体を用いたELISAの測定系を適用し、術式は常法に従った。結果を表3にまとめる。

表 3

試 料	A P C	未活性化プロテインC
	比活性(U/mg)	含量(%:W/W)
本発明調製物 1	5 7 5 0.5	0.4 7
本発明調製物 2	5 1 0 7.8	1.2 2
本発明調製物 3	4 4 5 7.1	0.3 6
従来調製物 1	2 6 6 1.7	5.4 1
従来調製物 2	3 2 8 6.2	5.8 3
従来調製物 3	2 4 7 0.4	3.9 3

比活性の低い従来調製物では4～6%の未活性化プロテインCが含まれているのに対し、比活性の高い本発明の調製物では0.4～1.2%しか含有されていなかった。確かに従来法の調製物中の未活性化プロテインC含量は高いが、この含量は僅かであり調製物の比活性に直接影響しているとは考え難い。そこで、この点を確認するため、最も未活性化プロテインC含量の低い本発明調製物3に、最終濃度が5%となるように未活性化プロテインCを添加してAPC活性(APTT)を測定したところ、未活性化プロテインCを添加しない場合に比較して、APTT測定値に変化は認められなかった(表4)。従って、未活性化プロテインC含量の低下が本発明の調製物にみられるAPC比活性の上昇の主たる原因とは考えられない。

表 4

試 料	A P C 比活性(U/mg)	
	プロテインC未添加	5%プロテインC添加
本発明調製物 3	5 0 7 7 . 9	5 1 7 3 . 7
従来調製物 3	2 7 2 6 . 0	2 7 2 5 . 7

実施例 3

## (活性化プロテインC製剤の調製)

工業スケールのヒト新鮮凍結血漿100Lを冷融解し、生じた沈殿物を遠心分離した上清を陰イオン交換体(DEAE-セファデックス A-50)に添加し、0.1Mの塩化ナトリウムを含む20mMクエン酸緩衝液(pH 7.0)にて十分に洗浄を行ない、0.5Mの塩化ナトリウムを含む20mMクエン酸緩衝液(pH 7.0)にてG1aドメインを有するヒトプロテインC画分を溶出した。

この溶液に30mMの塩化カルシウムを加えた後に抗プロテインC抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーのカラムに添加し、0.15Mの塩化ナトリウム、2mMの塩化カルシウムを含む50mM Tris-HCl 緩衝液(pH 8.0)にて充分洗浄し、0.15Mの塩化ナトリウムを含む20mMクエン酸緩衝液(pH 6.0)でプロテインCを溶出した。

この溶液を0.1N水酸化ナトリウムでpH 8.0に調整した後に陰イオン交換体(Q-セファロース Fast Flow)のカラムに添加し、0.15Mの塩化ナトリウムを含む50mM Tris-HCl 緩衝液(pH 8.0)で充分に洗浄し、0.4Mの塩化ナトリウムを含む0.3Mグリシン緩衝液(pH 7.0)にて溶出した。この段階で得られたプロテインCはSDS-PA

GEでは一本のバンドとして確認された。

活性化に際して、上記の方法により精製されたプロテインC溶液を、20 mMクエン酸緩衝液(pH 6.0)にてプロテインC濃度4 mg/mlに希釈する。この溶液にトロンビンを最終濃度60 U/mlになるように添加し、37℃で5時間加温してプロテインCを活性化した。

活性化後、トロンビンの除去を行なう為に活性化後の溶液を20 mMクエン酸緩衝液(pH 6.0)で2倍に希釈し、陽イオン交換体(SP-トヨパール)のカラムに添加した。60 mMの塩化ナトリウムを含む20 mMクエン酸緩衝液(pH 6.0)で十分に洗浄し、0.35 Mの塩化ナトリウムを含む20 mMクエン酸緩衝液(pH 6.0)で活性化プロテインCを溶出させた。この条件ではトロンビンは溶出されず活性化プロテインCのみが溶出されトロンビンが除去される。得られた活性化プロテインC溶液はウイルス除去膜(プラノバ35N 旭化成(株)製)による濾過を行なった。なお、この溶液中の活性化プロテインCの比活性は5392.7 U/mg、残存トロンビン濃度は0.001単位/ml以下であった。

この濾液を最終濃度が0.7%塩化ナトリウム(W/V)、0.5%グリシン(W/V)、0.6%クエン酸ナトリウム(W/V)、ヒトアルブミン2.5%(W/V)、プロテインC活性600単位/mlになるように調整した。調製された活性化プロテインC溶液は無菌濾過、凍結乾燥後、ウイルス不活化の為に65℃、96時間の乾燥加熱を行ない最終的に医療用に使用しうる活性化プロテインCを得た。

## 請 求 の 範 囲

1. 正常ヒト血漿の活性化トロンボプラスチン時間(APTT)を2倍に延長する量として定義される単位に基づく活性単位を指標として、3500単位/mgより高い比活性を示し、トロンビンまたは等価なプロテアーゼおよび/または未活性化プロテインCを実質的に含んでいないヒト活性化プロテインC調製物。
2. 比活性が4000単位/mg以上である請求項1記載のヒト活性化プロテインC調製物。
3. トロンビンまたは等価なプロテアーゼによるヒトの未活性化プロテインCの活性化によって製造される請求項1または2に記載のヒト活性化プロテインC調製物。
4. トロンビンまたは等価なプロテアーゼによる活性化後、ヒト活性化プロテインC含有溶液をpH5.0~6.0、塩濃度80mM以下の条件で陽イオン交換体に接触させ、トロンビンとヒト活性化プロテインCを吸着させ、塩濃度0.1~0.35Mの条件でヒト活性化プロテインCのみを溶出させることを特徴とするヒト活性化プロテインCの精製法。
5. 以下の諸工程を含むことを特徴とする、請求項1記載のヒト活性化プロテインC調製物の調製法：
  - (1)ヒトプロテインCを含有する溶液を陰イオン交換体に吸着させた後、溶出させ、G1aドメインを有するヒトプロテインC画分を調製し、
  - (2)ヒトプロテインCを含有する溶液を、カルシウムイオンと結合したプロテインCを特異的に認識する抗体を不溶性担体と結合した吸着体にカルシウム存在下で吸着させ、クエン酸緩衝液を用いて当該プロテインCを溶出し、
  - (3)プロテインC含有溶液を陰イオン交換体に吸着させた後、溶出させて

上記プロテインC含有溶液より抗プロテインC抗体を除去し、

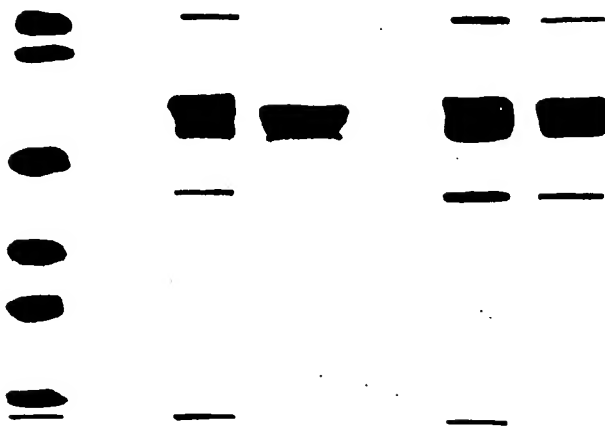
(4)ヒトプロテインCをトロンビンまたは等価なプロテアーゼを用いて活性化する際に、ヒトプロテインCを含有する溶液にpH 6.0～8.0の条件でトロンビンをトロンビン／プロテインC 1～20(U/mg)の量比で添加してヒトプロテインCを活性化し、ついで

(5)活性化後のヒト活性化プロテインC含有溶液をpH 5.0～6.0、塩濃度80mM以下の条件で陽イオン交換体に接触させてトロンビンと活性化プロテインCを吸着させ、ついで塩濃度0.1～0.35Mの条件でヒト活性化プロテインCのみを溶出させ回収する。

図 1

(非還元)

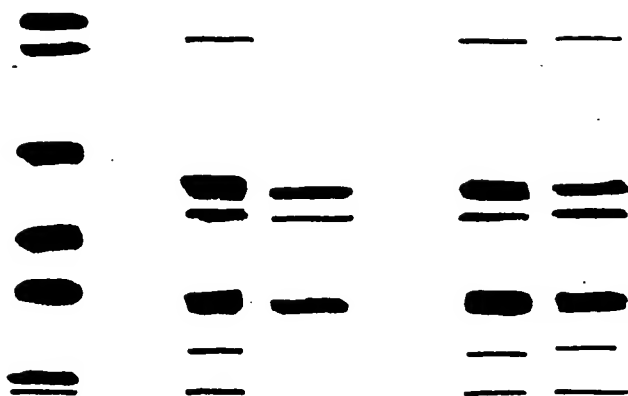
M A-1 A-2 B-1 B-2



M: 分子量マーカー  
 A-1: 本発明処理前液  
 A-2: 本発明吸着・溶離  
 B-1: 従来法処理前液  
 B-2: 従来法素通り

(還元)

M A-1 A-2 B-1 B-2



M: 分子量マーカー  
 A-1: 本発明処理前液  
 A-2: 本発明吸着・溶離  
 B-1: 従来法処理前液  
 B-2: 従来法素通り

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP94/01807

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl<sup>6</sup> C12N9/64

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl<sup>5</sup> C12N9/50-9/64

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS PREVIEWS, WPI

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	JP, A, 5-064588 (Teijin Ltd.), March 19, 1993 (19. 03. 93), (Family: none) Lines 18 to 36, left column, page 4	1-4 5
Y A	WO, A1, 91/00912 (ZymoGenetics, Inc.), August 22, 1991 (22. 08. 91) Right column, page 7	1-4 5

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

December 12, 1994 (12. 12. 94)

Date of mailing of the international search report

January 10, 1995 (10. 01. 95)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.



A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) <b>Int. Cl. C12N9/64</b>		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) <b>Int. Cl. C12N9/50-9/64</b>		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) <b>BIOSIS PREVIEWS, WPI</b>		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y A	JP, A, 5-064588 (帝人株式会社), 19. 3月. 1993 (19. 03. 93) (ファミリーなし) 第4ページ, 左欄, 第18行-第36行	1-4 5
Y A	WO, A1, 91/00912 (ザイモジェネティクス, インコーポレイテッド), 22. 8月. 1991 (22. 08. 91) 第7ページ, 右欄	1-4 5
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 <b>12. 12. 94</b>	国際調査報告の発送日 <b>10.01.95</b>	
名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) <b>佐 伯 裕 子</b>	<b>4 B 9 1 5 2</b>
電話番号 03-3581-1101 内線		<b>3449</b>

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**